

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE de MADRID**

**FACULTAD de ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO de ESTOMATOLOGÍA III**



**MÁSTER CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**Trabajo de Investigación**

**EFECTO de la HORMONA de  
CRECIMIENTO en el HUESO VIEJO:  
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO y  
DENSITOMÉTRICO en RATAS WISTAR.  
ESTUDIO PILOTO**

**ALEXANDRA DUARTE RUGGIERO**

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE de MADRID**

**FACULTAD de ODONTOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO de ESTOMATOLOGÍA III**



**MÁSTER CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**Trabajo de Investigación**

**EFECTO de la HORMONA de  
CRECIMIENTO en el HUESO VIEJO:  
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO y  
DENSITOMÉTRICO en RATAS WISTAR.  
ESTUDIO PILOTO**

**ALEXANDRA DUARTE RUGGIERO**

Tutora: Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil

**Madrid, 2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Mi más sincero agradecimiento a mi tutora del Trabajo de Fin de Máster, Profa. Dra. Isabel Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por transmitirme la ilusión por el campo de la investigación y por su tiempo y dedicación.*

*También quiero agradecer:*

*Al Prof. Dr. Jesús A. Fernández-Tresguerres, de la Facultad de Medicina de la UCM, por el asesoramiento y financiación de este trabajo.*

*A la Profa. Dra. Celia Clemente, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares, por haber llevado a cabo el estudio histológico, morfométrico y densitométrico.*

*A mis padres, por darme fuerzas en los momentos difíciles y por el apoyo que me han brindado.*

*A Andrés, por los ánimos, paciencia y comprensión, muchas gracias.*

## RESUMEN

El envejecimiento produce cambios en todos los sistemas y aparatos del organismo, incluyendo el tejido óseo. Entre las teorías que explican el proceso de envejecimiento, destaca la teoría de la disminución hormonal y entre las hormonas que se reducen con la edad se encuentra la hormona de crecimiento (GH).

La GH es un péptido de 191 aminoácidos sintetizada no sólo en la adenohipófisis sino también en muchas otras células del organismo, por lo que se ha considerado recientemente como un factor de crecimiento local. Respecto al hueso, se sabe que la administración sistémica de GH es capaz de incrementar la densidad mineral ósea en animales con osteopenia y de aumentar las propiedades biomecánicas tras la fractura tibial experimental en animales jóvenes. Lo que no está claro es su efecto en el hueso de animales viejos.

El propósito de este estudio piloto fue doble: en primer lugar evaluar el efecto que el envejecimiento produce en la tibia de ratas Wistar y en segundo lugar valorar el efecto que la administración sistémica de GH pudiera tener en el hueso de ratas viejas, comparando con ratas viejas control.

**Material y método:** Se emplearon un total de 15 ratas Wistar hembras, 5 jóvenes y 10 viejas. A 5 ratas viejas escogidas aleatoriamente se les administró 2 mg/kg/día de rhGH (*recombinant human GH*) subcutáneamente dos veces al día durante 10 semanas. El resto, tanto jóvenes como viejas permanecieron como controles. A los 70 días se sacrificaron los animales, se extrajeron ambas tibias, se eliminaron los tejidos blandos y se fijaron en formaldehído al 10% tamponado a pH 7. Posteriormente se incluyeron en metacrilato para facilitar el corte y evitar la decalcificación. Los bloques se cortaron mediante el microtomo Exakt® y las muestras obtenidas se tiñeron con azul de Toluidina y tricómico de Masson para su estudio mediante microscopía óptica. Se realizó un análisis morfométrico de las preparaciones de las tibias derechas para cuantificar diferentes áreas (área total, área ósea, área cortical, área medular), así como se midieron las áreas del borde anterior, cara interna, cara externa y cara posterior. Asimismo, se efectuó un análisis densitométrico en las tibias izquierdas mediante el densitómetro XR-Norland®, modalidad de investigación, para valorar la densidad mineral ósea (DMO). Estos resultados cuantitativos se sometieron a un análisis

estadístico mediante la aplicación del sistema SPSS 22.0. Se realizó una t-Student para muestras independientes considerándose  $p < 0,05$  como significativo.

**Resultados:** El envejecimiento produce una menor densidad mineral ósea en las tibias de ratas viejas, aunque sin significación estadística y disminuye las áreas total, ósea, medular y cara posterior en las secciones histológicas de las tibias.

La hormona de crecimiento administrada de forma sistémica a dosis de 2 mg/kg/día es capaz de aumentar de forma estadísticamente significativa el área ósea y el área cortical de las tibias de las ratas Wistar viejas, sin afectar al área medular, que aumenta pero de forma no significativa. Asimismo, es capaz de incrementar significativamente la DMO, llegando a superar los valores de las ratas jóvenes.

**Conclusiones:** Dentro de las limitaciones de este estudio piloto, se puede concluir que el envejecimiento produce una reducción de la densidad mineral ósea, así como de todas las áreas medidas excepto del borde anterior.

La administración sistémica de GH es capaz de aumentar el área ósea y el área cortical de forma estadísticamente significativa en las tibias de ratas viejas, así como la densidad mineral ósea, superando ésta última los valores existentes en ratas jóvenes.

## ***ÍNDICE DE ACRÓNIMOS***

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>AC</b>                | Área cortical  |
| <b>AM</b>                | Área medular   |
| <b>AO</b>                | Área ósea  |
| <b>AP</b>                | Fosfatasa alcalina   |
| <b>Arg-Gly-Asp (RGD)</b> | Tripéptido arginina-glicina-aspartato  |
| <b>AT</b>                | Área total   |
| <b>BA</b>                | Borde anterior   |
| <b>BMP</b>               | Proteína morfogenética ósea  |
| <b>BMU</b>               | Unidades básicas multicelulares (del inglés <i>Basic Multicellular Units</i> ) |
| <b>CE</b>                | Cara externa   |
| <b>CI</b>                | Cara interna   |
| <b>CP</b>                | Cara posterior   |
| <b>DAC</b>               | Densidad de área cortical  |
| <b>DAM</b>               | Densidad de área medular   |
| <b>DAO</b>               | Densidad de área ósea  |
| <b>DMO</b>               | Densidad mineral ósea  |
| <b>et al</b>             | Abreviatura de la expresión latina <i>et alii</i> . (Significa “y otros”)      |
| <b>GH</b>                | Hormona del crecimiento  |
| <b>IGF-I</b>             | Factor de crecimiento análogo a la insulina I                                  |
| <b>IGF-II</b>            | Factor de crecimiento análogo a la insulina II                                 |
| <b>M-CSF</b>             | Factor estimulante del crecimiento de colonias de macrófagos                   |
| <b>OPG</b>               | Osteoprotegerina   |
| <b>PDGF</b>              | Factor de crecimiento derivado de plaquetas                                    |
| <b>PTH</b>               | Parathormona   |
| <b>RANK</b>              | Receptor activador del factor nuclear $\kappa$ B                               |
| <b>RANKL</b>             | Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa$ B                   |
| <b>rhGH</b>              | Hormona de crecimiento recombinante humana                                     |
| <b>rpGH</b>              | Hormona de crecimiento recombinante porcina                                    |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>SD</b>                     | Desviación estándar                         |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Factor de crecimiento transformante $\beta$ |
| <b>TNF</b>                    | Factor de necrosis tumoral                  |
| <b>TRAP</b>                   | Fosfatasa ácida tartrato resistente         |

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Introducción</b>                             | 10 |
| 1.1. Tejido óseo                                   | 10 |
| 1.1.1. Estructura                                  | 10 |
| 1.1.1.1. Células                                   | 11 |
| A. Osteoblastos                                    | 11 |
| B. Osteoclastos                                    | 12 |
| C. Osteocitos                                      | 12 |
| D. Células de revestimiento                        | 13 |
| 1.1.1.2. Matriz orgánica                           | 13 |
| A. Colágeno  | 14 |
| B. Proteínas no colágenas                          | 14 |
| 1.1.1.3. Fase mineral                              | 15 |
| 1.1.2. Función                                     | 16 |
| 1.1.2.1. Homeostasis fosfocálcica                  | 16 |
| 1.1.2.2. Remodelado                                | 17 |
| 1.1.3. Alteraciones del hueso en el envejecimiento | 18 |
| 1.1.3.1. Estructura                                | 19 |
| 1.1.3.2. Función                                   | 20 |
| 1.2. Hormona del Crecimiento                       | 21 |
| 1.2.1. Efectos en el hueso                         | 22 |
| 1.3. Antecedentes y Justificación                  | 23 |
| 1.4. Hipótesis de trabajo y Objetivos              | 23 |
| <b>2. Material y Método</b>                        | 25 |
| Animales   | 25 |
| Análisis histológico                               | 25 |
| Análisis morfométrico                              | 26 |
| Análisis densitométrico                            | 26 |



|   |    |
|---|----|
| Análisis estadístico  | 27 |
| <b>3. Resultados</b>  | 28 |
| Resultados histológicos   | 28 |
| Resultados morfométricos  | 28 |
| Resultados densitométricos  | 29 |
| <b>4. Discusión</b>   | 31 |
| 1. Efecto del envejecimiento en la tibia de rata Wistar                                     | 31 |
| 1.1 Cambios histológicos  | 31 |
| 1.2 Disminución de la DMO   | 31 |
| 1.3 Disminución de las áreas óseas  | 32 |
| 2. Efecto de la administración sistémica de GH en ratas Wistar viejas                       | 33 |
| 2.1. Cambios histológicos   | 33 |
| 2.2. Aumento de la DMO  | 33 |
| 2.3. Aumento de las áreas óseas   | 34 |
| 3. Mecanismos por los cuales la GH aumenta la DMO y las áreas<br>óseas en el envejecimiento | 35 |
| 4. Investigaciones futuras  | 36 |
| <b>5. Conclusiones</b>  | 37 |
| <b>6. Bibliografía</b>  | 38 |
| <b>7. Tablas</b>  | 43 |
| <b>8. Figuras</b>   | 45 |

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. TEJIDO ÓSEO**

El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado cuya formación empieza en el primer trimestre de vida intrauterina y durante toda la vida del individuo sufre el proceso de remodelado óseo mediante la reabsorción del hueso existente y la aposición de nuevo tejido óseo (1). Es, por tanto, un tejido dinámico que en condiciones normales se remodela un 5-15% anualmente. Este proceso de remodelado consiste en la reabsorción de hueso, llevada a cabo por los osteoclastos, seguida de la formación de matriz osteoide por los osteoblastos. Una vez segregada esta matriz, se producirá su mineralización (2).

Cumple las funciones de soporte biomecánico y locomoción, protege los órganos internos y aloja en su interior la médula ósea encargada de la hematopoyesis. Además, es un reservorio de iones fosfato y calcio, participando en la homeostasis de estos minerales (2).

#### **1.1.1. Estructura**

El hueso es un tejido conectivo altamente especializado, muy vascularizado e innervado y está compuesto por matriz osteoide, fase mineral y células. Su estructura básica es la osteona o sistema de Havers. Cada osteona está constituida por laminillas con disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso cortical o compacto constituye el 80% del tejido óseo, se localiza principalmente en las diáfisis de los huesos largos y en las superficies de los planos y se caracteriza por el sistema Haversiano. Los canales de Volkmann son perpendiculares a los de Havers para suministrar sangre del periostio al centro. El hueso esponjoso o trabecular se encuentra principalmente en las epífisis de los huesos largos y en el interior de los huesos cortos. Es un entramado de trabéculas interconectadas que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se aloja la médula ósea. Es menos denso que el hueso cortical pero metabólicamente más activo (1-3).

Histológicamente es un tejido conjuntivo, mineralizado, innervado e vascularizado, estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. Tanto el hueso cortical como el esponjoso están compuestos por células especializadas, matriz orgánica y fase mineral.

#### **1.1.1.1. Células**

Las células óseas pueden encontrarse dentro del propio tejido óseo o en el estroma de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales. En la tabla 1 se observa la diferente celularidad y su localización.

**A. Osteoblastos:** Los osteoblastos son las células formadoras de hueso y encargadas de formar y mineralizar la matriz ósea. Sintetizan las proteínas de la matriz y controlan la concentración de iones en la zona. Los osteoblastos derivan de las células mesenquimales pluripotenciales que están en la médula ósea, endostio, periostio y en los pericitos perivasculares. Se comunican con el resto de osteocitos y osteoblastos mediante los procesos citoplasmáticos inmersos en los conductos calcóforos. Poseen integrinas o proteínas transmembrana que participan en el enlace entre las células y entre la célula y la matriz extracelular. Además estas proteínas transmembrana permiten el paso de mensajeros como el calcio, citoquinas o prostaglandinas. Los osteoblastos son los encargados de sintetizar una cantidad de 2-3µm por día de matriz orgánica y expresan la enzima fosfatasa alcalina (ALP), que es la enzima de la mineralización. Además, los osteoblastos sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, incluyendo los factores de crecimiento que existen en condiciones normales dentro de la matriz ósea (2,4).

Al principio, se produce la síntesis de osteoide llevada a cabo por los osteoblastos. La sustancia se va acumulando en unas vesículas que se hacen extracelulares, en las que además hay fosfatasa alcalina y fosfolípidos ácidos afines por el calcio. La fosfatasa alcalina produce la hidrólisis de los ésteres fosfóricos liberándose fosfato que es imprescindible para que se origine el mineral de fosfato cálcico amorfo, que posteriormente cristaliza. Cuando se acumulan muchos cristales se perforan las paredes de la vesícula y salen al exterior, precipitando entre las fibras de colágeno. Puesto que estas fibras no tienen afinidad por el

calcio ni el fosfato, en el interior de las vesículas hay unas proteínas no colágenas (osteopontina, osteocalcina y sialoproteína ósea) que sí tienen afinidad por el calcio y favorecen la cristalización del mineral y su depósito sobre la matriz osteoide (2).

La primera parte de la mineralización la llevan a cabo los osteoblastos, pero la segunda parte se basa en el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, siendo en un 35% un proceso acelular (2).

**B. Osteoclastos:** Las células encargadas de la reabsorción del tejido óseo son los osteoclastos. Son células grandes multinucleadas, que contienen fosfatasa-ácida-tartrato-resistente (TRAP), cuya función es permitir la defosforilación de las proteínas. Proceden de las células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos”, que también son precursoras de granulocitos y macrófagos. Su función es degradar localmente la matriz ósea y mineral durante la reabsorción ósea, siguiendo las señales de los osteoblastos y osteocitos (5). Actualmente se sabe gracias a los trabajos de Simonet et al (1997) que la osteoclastogénesis está regulada por el sistema RANK-RANKL-osteoprotegerina (2,6) (4). La osteoprotegerina (OPG), es una proteína que es sintetizada por los pre-osteoblastos y los osteoblastos, el RANKL es un ligando existente en la membrana de pre-osteoblastos y osteoblastos y que también se libera al medio y se une al RANK (receptor de RANKL situado en las membranas de osteoclastos y pre-osteoblastos). El RANKL es un ligando del receptor, activador del factor nuclear  $\kappa B$ , es decir, es una citoquina que pertenece a la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y que cuando se une a su receptor RANK, activa la diferenciación y la actividad de los osteoclastos, produciendo un aumento de la reabsorción ósea. La OPG, es un receptor de la familia del TNF que inhibe la acción de RANKL, ya que al unirse a este ligando inhibe la unión RANKL-RANK evitando la reabsorción. (2,4).

**C. Osteocitos:** Una vez que se mineraliza la matriz, los osteoblastos que quedan atrapados dentro pasan a llamarse osteocitos. Son diez veces más numerosos que los osteoblastos; son aproximadamente el 90% de las células del hueso. Son células con forma estrellada cuyo cuerpo se encuentra dentro de las lagunas óseas u osteoplasmas, y sus procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos, en cuyo interior

hay fluido óseo extracelular (2,4). Las uniones entre estas células están compuestas por la conexina 43, proteína necesaria para el modelado y remodelado óseo. Tienen una vida media de 1 a 50 años. Además son las células más sensibles a las señales mecánicas, reparando las microfracturas que se producen con la edad (5).

**D. Células de revestimiento:** La superficie del hueso quiescente, es decir, el hueso que no está en proceso de remodelado, está cubierto por 1-2  $\mu\text{m}$  de matriz de colágeno no mineralizado en cuya parte superior hay una capa de células planas y alargadas. Estas células se llaman células limitantes u osteocitos de revestimiento (7). Se trata de células planas y alargadas, con núcleo en forma de huso y pocas organelas. Expresan diferentes marcadores osteoblásticos como la sialoproteína ósea, la osteopontina, osteonectina y la fosfatasa alcalina (2). Una vez finalizada la función de los osteoblastos, éstos se convierten en osteocitos que quedan embebidos en la matriz mineralizada o en células limitantes cubriendo la superficie del hueso (8). Durante años se creyó que eran células inactivas. Sin embargo, actualmente se sabe que las células de revestimiento están interconectadas con la red de osteocitos por uniones tipo gap. Además reciben señales de daño o estrés que serían transmitidas y permitiría el reclutamiento de osteoclastos en el área (9). La rapidez con la que el hueso se forma tras un breve episodio de carga y la falta de dependencia de una fase anterior de reabsorción ósea, plantea la posibilidad de que las células osteoblásticas implicadas en la respuesta osteogénica resulten de la reactivación de las células de revestimiento del hueso que se encuentran quiescentes. También se ha sugerido que la parathormona (PTH) causa diferenciación de estas células hacia osteoblastos activos (10).

#### **1.1.1.2. Matriz orgánica**

Por otro lado, la matriz orgánica o sustancia osteoide, está formada principalmente por proteínas estructurales que proporcionan al hueso resistencia frente a las fuerzas de tensión y proteínas funcionales que participan en la regulación del proceso de remodelado (2,4). Es, por tanto, un sistema dinámico. Está compuesta por:

## A. Colágeno

El 90% es colágeno tipo I, uno de los 14 tipos de colágeno presentes en el organismo. Es una proteína fibrilar, consiste en una triple hélice de cadenas polipeptídicas, dos  $\alpha$ -1 y una  $\alpha$ -2. Contiene múltiples enlaces intra e intermoleculares que aumentan su resistencia. Existe también pequeñas proporciones de colágeno tipo III y V. Contiene los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, que son indicadores específicos de este colágeno tipo I. Además, su tasa de excreción urinaria (hidroxiprolinuria) está directamente relacionada con la cantidad de reabsorción ósea. Dado que el colágeno no tiene afinidad por el calcio, otras proteínas no colágenas como la osteocalcina, osteonectina y osteopontina son las encargadas del depósito mineral (1,2). Contiene la secuencia de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) que es reconocida por las células óseas, para su adhesión a la matriz.

## B. Proteínas no colágenas

- i. *Proteoglicanos*: son proteínas hidrofílicas de gran tamaño que aumentan la resistencia del tejido óseo a la compresión. Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Hay cuatro tipos de proteoglicanos: Hialuronano y Condroitín-sulfato (participan en las etapas iniciales de la formación ósea) y Biglicano y Decorina (aparecen en las fases siguientes de la formación del hueso) (1,2)
- ii. *Proteínas con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico*: Este ácido es un aminoácido que une calcio y para su síntesis necesita vitamina K. Pertenecen a este grupo la osteocalcina y la proteína de la matriz con ácido  $\gamma$ -carboxi-glutámico. La osteocalcina es sintetizada por los osteoblastos. Sus niveles plasmáticos se relacionan con la actividad y número de los osteoblastos y por tanto es un marcador de la osteogénesis (2).
- iii. *Glicoproteínas*: son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp). La osteonectina tiene una alta afinidad por el colágeno tipo I, por el calcio y por la hidroxiapatita. Es necesaria para la mineralización normal. Se piensa que regula la adhesión entre la matriz y las células. La fosfatasa alcalina

(ALP) es una enzima necesaria para la mineralización ya que libera fosfato inorgánico. Las proteínas con el tripéptido RGD son fundamentalmente la osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina, e intervienen en los procesos de remodelado y regeneración. También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales (2).

- iv. *Proteínas procedentes del plasma:* están en la matriz orgánica del hueso en mayor proporción que en el plasma sanguíneo. Son la albúmina y la 2-SH-glicoproteína, las cuales se cree que están relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide (2). (Tabla 2)
- v. *Factores de crecimiento:* son polipéptidos que se sintetizan en el hueso o en otros lugares del organismo como en el hígado o las plaquetas. Intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células tanto de manera autocrina como paracrina (2).
- vi. *Metaloproteasas (MMPs):* son enzimas que degradan el colágeno y actúan en el proceso de reabsorción.

#### **1.1.1.3. Fase mineral**

Finalmente, la fase mineral es el 65% del peso óseo. Está compuesta por calcio y fosfato en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), y en menor proporción brushita y monetita. Asimismo, también contiene los iones de magnesio, sodio, potasio, estroncio, manganeso y flúor en pequeñas cantidades (2). Esta fase constituye el 99% del calcio del organismo (que supone alrededor de 1 Kg de calcio) (1), y proporciona al hueso la resistencia a fuerzas compresivas (4).

Los cristales de hidroxiapatita se depositan según la orientación de las fibras de colágeno. Además, debido a los altos niveles de calcio y fósforo que existen en condiciones normales en el plasma sanguíneo, existen sustancias que inhiben la mineralización, como los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato (2).

### **1.1.2. Función**

Las principales funciones fisiológicas del hueso son: (4)

- Hematopoyesis: la médula de los huesos largos contiene células madres mesenquimales capaces de diferenciarse a cualquier precursor hematopoyético que en última instancia da lugar a las células sanguíneas.
- Balance ácido-básico: el hueso proporciona tampones o buffers en forma de carbonatos o fosfatos durante la acidosis metabólica, permitiendo el intercambio de  $H^+$  por cationes en el hueso. El carbonato de calcio es el buffer más importante que proporciona un reservorio de iones bicarbonato.
- Reserva mineral: el hueso almacena aproximadamente el 99% del calcio y el 85% del fósforo de nuestro organismo (4), participando en la homeostasis fosfocálcica.
- Función estructural: La matriz del hueso tiene una alta resistencia a la compresión, pero es susceptible a fracturas por altas cargas de tracción o fuerzas de tensión. Tiene un grado de elasticidad (debido al colágeno que se encuentra en la matriz orgánica).

#### **1.1.2.1. Homeostasis fosfocálcica**

Consiste en el intercambio de calcio y fósforo desde el hueso hacia el espacio extracelular y desde éste al fluido óseo. Este fluido, que se encuentra en el interior de la red de canalículos calcóforos y de los osteoplasmas rodeando a los osteocitos, llega hasta las células de revestimiento ubicadas en la superficie del hueso, en contacto con el líquido extracelular. El calcio sale del hueso por la acción osteoclástica.

El calcio existe en mayor concentración en el líquido extracelular que en el citoplasma celular. El mantenimiento de la concentración plasmática de calcio se debe a dos hormonas: la PTH, hormona pro-reabsorción de acción rápida y el calcitriol (1,25-



dihidroxicolecalciferol), de acción más lenta, que aumenta la absorción intestinal de calcio y fósforo. El descenso de la calcemia es el estímulo para la liberación de PTH desde las glándulas paratiroides. Los derivados de la vitamina D o calciferoles estimulan la síntesis de proteínas no colágenas en el hueso y la mineralización.

#### **1.1.2.2. Remodelado**

El proceso de remodelado óseo es aquel que permite la remoción de una determinada cantidad de hueso llevada a cabo por los osteoclastos, seguido de la formación de la misma cantidad de tejido osteoide por parte de los osteoblastos, que posteriormente se mineralizará. Consiste entonces en una reabsorción previa a una aposición del tejido (3). Ocurre tanto en el esqueleto infantil como en el adulto, pero sólo hasta la tercera década de la vida tiene un balance positivo. El proceso de remodelado asegura reparar el daño en la microarquitectura del hueso, por ejemplo durante el envejecimiento.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en las llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (*basic multicellular units*) que se encuentran en áreas de la cortical o de la superficie trabecular. En ellas se encuentran las células encargadas del proceso (osteoclastos, pre-osteoclastos, pre-osteoblastos, osteoblastos y células limitantes) (3,4,11).

Las células responden y actúan frente a los distintos estímulos del entorno: mecánicos, eléctricos, estructurales o químicos. El remodelado óseo, está regulado por hormonas sistémicas y factores de crecimiento que actúan conjuntamente para mantener la masa ósea normal (12), regulando acciones celulares como la migración, la proliferación o la diferenciación celular. En ese sentido, los factores de crecimiento ejercen un papel importante en el remodelado y la reparación ósea ya que regulan acciones celulares como la migración, la proliferación o la diferenciación celular.

Las fases de remodelado óseo son: (11)

1. Fase Quiescente: el hueso se encuentra en reposo. No se conoce bien el mecanismo de activación del remodelado óseo.

2. Fase de activación: las células limitantes se retraen y liberan RANKL. las colagenasas digieren la membrana endóstica. Cuando la superficie mineralizada queda expuesta, el RANKL provoca la atracción de los pre-osteoclastos procedentes de la circulación.
  3. Fase de reabsorción: los osteoclastos se encargan de disolver la matriz mineral y descomponer la matriz osteoide y los macrófagos son los encargados de terminar este proceso, que tarda unos 10 días. Se liberan los factores de crecimiento contenidos en la matriz, como TGF- (factor transformante del crecimiento ), IGF I y II (factor análogo a la insulina I y II) y PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas).
  4. Fase de formación: en las zonas reabsorbidas y atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz se acumulan los pre-osteoblastos. Éstos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a fijar el nuevo tejido. Expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas) responsables de la diferenciación hacia osteoblastos. Una vez diferenciados, los osteoblastos van a sintetizar la sustancia osteoide.
  5. Fase de mineralización: 30 días después del depósito de tejido osteoide, empieza la mineralización que finalizará en el hueso cortical a los 130 días y en el trabecular a los 90 días.
- Terminadas todas las fases el hueso vuelve de nuevo a la fase quiescente. (11).

### **1.1.3. Alteraciones del hueso en el envejecimiento**

Durante la pubertad, se produce un aumento importante de la masa ósea por la acción de los esteroides sexuales y la hormona del crecimiento. Luego, hasta los 30 años se produce un aumento gradual de la masa ósea. Hasta los 50 años se mantiene, pero a partir de los 50 empieza a descender. Con la edad, sobre todo en mujeres postmenopáusicas, se acelera la pérdida de masa ósea (13), debido al descenso de estrógenos.

Durante el envejecimiento se producen una serie de cambios hormonales como son la menor secreción de hormona de crecimiento, y por tanto, disminución de los niveles de IGF-I circulante, proceso conocido como “somatopausia” (14), además de la disminución de estrógenos en las mujeres menopáusicas y de testosterona en los hombres (15). La melatonina

endógena también desciende, por lo que se ha planteado que las alteraciones que se producen durante el envejecimiento podrían ser debidas a la disminución hormonal.

Como se ha hecho referencia anteriormente, el hueso participa en las funciones mecánicas y de homeostasis del organismo, protegiendo a los órganos internos, permitiendo la locomoción y soporte de cargas, alberga la médula ósea en su interior y es el principal reservorio de calcio. Con el envejecimiento, estas funciones se alteran, el hueso se vuelve más frágil y pierde elasticidad. Los ancianos mayores de 85 años (tanto mujeres como hombres) sufren entre 10 y 15 veces más riesgo de fracturas que los de 60-65 años. Hay que tener en cuenta que además la densidad mineral ósea puede estar disminuida con el envejecimiento y en mujeres mayores de 65 años puede aparecer una patología concreta, como es la osteoporosis.

#### **1.1.3.1. Estructura**

Muchos estudios confirman que con la edad el hueso se vuelve más frágil y débil. Las trabéculas óseas también se debilitan, haciéndose más finas y aumentando su separación. La resistencia del tejido óseo depende tanto de la cantidad de tejido mineral como de su distribución según las fuerzas que recibe el hueso (16). Así, la resistencia del hueso viene determinada por su tamaño y su forma, que van cambiando(15,16) a lo largo de la vida, según los postulados de Wolff, para cumplir las funciones mecánicas, siendo lo suficientemente duro para resistir las fuerzas a las que está sometido.

Durante el desarrollo del individuo, las corticales se vuelven uniformemente más finas y el hueso adquiere una forma mas elipsoidal. Este proceso se conoce como “Deriva cortical” (17) y es debido a una menor formación y mayor reabsorción en la superficie interna mientras se va acumulando tejido óseo en la externa. Esto produce un adelgazamiento de la cortical a la vez que un aumento en el diámetro de los huesos largos. Este proceso va aumentando en personas mayores provocando huesos con corticales muy delgadas y porosas. En ancianos se produce además un aumento de la cavidad medular (18).

En la vejez, el hueso se endurece y pierde elasticidad. Esto se debe al aumento de la fase mineral y a la disminución de la fase orgánica. Distintos estudios han demostrado que la resistencia a la fractura va disminuyendo a medida que aumenta la mineralización. Se ha demostrado que la rigidez del hueso la proporciona el contenido mineral, mientras que la calidad de la matriz orgánica determina la elasticidad del tejido óseo (16).

Con la edad disminuye la masa ósea. Además existe una mayor probabilidad de tener osteoporosis. Por todo ello se produce un incremento en el riesgo de fracturas de cuello de fémur y aplastamientos vertebrales, con el coste sanitario que ello conlleva.

### **1.1.3.2. Función**

El hueso mantiene un equilibrio de sus componentes para resistir las fracturas. Es necesaria la rigidez y fuerza para resistir las cargas y la dureza para absorber la energía producida por las mismas. Un cambio en este equilibrio aumentando el contenido mineral, producirá huesos más duros pero a la vez más frágiles. Además, alteraciones en la estructura del colágeno producirá un endurecimiento de la matriz orgánica teniendo como consecuencia el aumento de la fragilidad.

El hueso está sometido a constantes cargas que a nivel microscópico producen microfracturas, que si no se reparan con el proceso de remodelado óseo puede producirse la fractura ósea. Estas microfracturas aumentan con la edad. Esto, junto a la disminución del remodelado óseo produce disminución de la resistencia de la cortical y de las trabéculas óseas.

Por otra parte, la formación ósea se reduce con la edad, debido a una disminución del número y función de los osteoblastos (19). En cambio, la reabsorción ósea aumenta (20). Asimismo, las células óseas osteoprogenitoras disminuyen con el envejecimiento y se altera su función, produciéndose lo que se ha denominado senescencia celular (21).

El mecanismo último de la etiopatogenia de los cambios óseos que se producen con la edad permanece desconocido, pero se han barajado varias hipótesis. Una de ellas es que con la edad se reduce el número de células mesenquimales pluripotenciales en la médula ósea (22) y también su función (23).

Las células del estroma-osteoblastos regulan el número y actividad de los osteoclastos a través de la expresión de RANKL, el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y la osteoprotegerina (OPG). Con el envejecimiento, aumenta gradualmente la expresión de RANKL a nivel óseo y en las células de la médula tanto de animales como de humanos, mientras que la expresión de OPG desciende o se mantiene inalterada (20).

## **1.2. HORMONA DEL CRECIMIENTO**

La hormona del crecimiento (GH) es un péptido de 191 aminoácidos que se sintetiza en la adenohipófisis y en otras células del organismo, por lo que ha sido considerada recientemente como un factor de crecimiento local (24). Existen receptores para esta hormona en prácticamente todas las células del organismo. Es la hormona anabolizante por excelencia, que estimula el desarrollo del organismo y produce el crecimiento longitudinal del cuerpo. Además, es un importante regulador del metabolismo óseo después del nacimiento (25). En el proceso de remodelado, la GH juega un papel fundamental regulando el balance entre la reabsorción y la formación del hueso, ya que es capaz de estimular el número y función tanto de osteoblastos como de osteoclastos (13).

Al principio, la GH recombinante humana se usaba únicamente para tratar el retraso en el crecimiento de niños con déficit de esta hormona. Sin embargo, ahora se sabe que la GH tiene efectos beneficiosos en el adulto. Se sabe desde el trabajo de Rudman et al (26), que la GH es capaz de aumentar tanto las capacidades intelectuales en ancianos (memoria, actividad psicomotriz, atención, etc), como las funciones de todos los órganos y sistemas (contractilidad del miocardio, función renal, aumento de la masa muscular y de la síntesis de colágeno, disminución del tejido adiposo, etc).

Con la edad, se produce una disminución de la secreción de hormona de crecimiento y de los niveles de su intermediario, el IGF-I (13-15). Se cree que una de las causas de la disminución de la masa ósea en el envejecimiento podría ser este declive del eje GH/IGF-I (14).

### 1.2.1. Efectos en el hueso

Se sabe que *in vitro* la GH incrementa el número y función de los osteoblastos, bien directamente (27), o a través del IGF-I (28). Pero también es capaz de aumentar la proliferación y diferenciación de los osteoclastos (13).

Por otra parte, se han realizado estudios *in vivo* en los que se han observado resultados positivos con la administración sistémica de GH (12, 13). En ratas jóvenes, la administración de GH produce un aumento de la masa ósea cortical induciendo la formación subperióstica de hueso, sin cambios en la superficie endóstica. El hueso neoformado se organiza igual que el hueso ya existente, es decir, en laminillas concéntricas y con la misma dirección de las fibras de colágeno. Con la retirada de la administración de GH cesa rápidamente la formación de hueso subperióstico en aquellas áreas donde existía una formación mínima antes de comenzar el tratamiento, sin embargo, en las zonas donde antes había formación de hueso activa, queda un efecto remanente de la GH. Además, esta hormona aumenta el recambio óseo al incrementar también la tasa de reabsorción (13).

En un estudio realizado por Raschke et al (29) en minipigs en los que se estaba realizando una distracción ósea, se aplicó GH recombinante porcina (rpGH) durante 10 días. Se demostró que la resistencia a la torsión del hueso neoformado del grupo tratado con GH era mayor que en el grupo control. Además, se analizaron los niveles séricos de IGF-I y éste aumentó en el grupo tratado un 440%, mientras que en el grupo control permaneció sin cambios. (29).

En otro estudio realizado por Christmas et al, (30) en 2002, demostraron que la administración de GH aumentó los niveles de IGF-I en mujeres y en hombres. En mujeres ancianas, la administración de GH durante 6 meses aumentó los niveles de osteocalcina circulante (marcador de formación ósea) y la excreción urinaria de deoxipiridinolina (marcador de reabsorción ósea) sin cambiar significativamente la densidad mineral ósea.

Igual ocurrió en el trabajo de Rudman et al (26) mencionado anteriormente ya que la DMO se incrementó en la columna lumbar después de 6 meses de tratamiento pero de forma no significativa.

### **1.3. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

En este sentido, y considerando que la esperanza de vida de la población va en aumento, con el consiguiente incremento del número de personas de la tercera edad y de la prevalencia del envejecimiento del hueso o de enfermedades como la osteoporosis; sabiendo que estos pacientes tienen disminuida la secreción de la hormona de crecimiento y que esta hormona presenta efectos positivos sobre el hueso, reflejados en distintos estudios (12,13,29,30); y debido a la falta de resultados concretos sobre la influencia de la aplicación sistémica de la hormona de crecimiento para demostrar qué efectos tiene en el hueso viejo, sobre todo en la densidad mineral ósea, creemos justificada la realización de este estudio como Trabajo de Investigación del Máster de Ciencias Odontológicas.

### **1.4. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

En función a lo expuesto anteriormente, nos planteamos la siguiente HIPÓTESIS DE TRABAJO: Si administráramos hormona de crecimiento de forma sistémica en ratas viejas, mejorarían las condiciones en las que se encuentra ese hueso viejo.

Basándonos en esta hipótesis, nuestro trabajo busca alcanzar los siguientes OBJETIVOS Generales y Específicos:

Generales:

1. Evaluar las diferencias que se producen con el envejecimiento en las tibias de ratas Wistar.
2. Valorar las diferencias que se producen en las tibias de ratas viejas con la administración sistémica de GH.

Específicos:

- 1.1. Valorar las diferencias histológicas entre las tibias de ratas viejas y jóvenes.

- 1.2. Evaluar las diferencias morfométricas entre las tibias de ratas viejas y jóvenes, midiendo área total, área ósea, área cortical, área medular, borde anterior, cara interna, cara externa y cara posterior.
  - 1.3. Estudiar las diferencias densitométricas entre las tibias de ratas viejas y jóvenes, mediante la medición de la densidad mineral ósea.
- 
- 2.1. Valorar las diferencias histológicas entre las tibias de ratas viejas con GH y las viejas control.
  - 2.2. Evaluar las diferencias morfométricas entre las tibias de ratas viejas con GH y las viejas control, midiendo el área total, área ósea, área cortical, área medular, borde anterior, cara interna, cara externa y cara posterior.
  - 2.3. Estudiar las diferencias densitométricas entre las tibias de ratas viejas con GH y las viejas control, midiendo la densidad mineral ósea.



## 2. MATERIAL Y MÉTODO

### Animales

Para la realización de este estudio piloto, se usaron 15 ratas Wistar hembras. Cinco ratas eran jóvenes de dos meses de edad y 10 ratas tenían 22 meses de edad. Los animales recibieron una dieta para ratas de laboratorio estándar (A.O4 Panlab, Barcelona, España) y agua *ad libitum*, y se mantuvieron en una habitación con luz y temperatura controlada. Las ratas jóvenes no fueron tratadas y sólo recibieron los correspondientes excipientes y solución salina, sirviendo de grupo de referencia, mientras que las ratas viejas se dividieron en dos grupos:

- Un grupo 1 sin tratar que sirvió de grupo control viejo.
- Un grupo 2 que se trató con rhGH (hormona de crecimiento recombinante humana) durante 10 semanas recibiendo una cantidad de 2 mg/kg/día (Saizen<sup>®</sup>, Serono, Madrid, España) de forma subcutánea dos veces al día (a las 10:00 h y 17:00 h)

Todos los animales recibieron cuidados según las Guías para el cuidado ético de animales de experimentación en la Unión Europea y el estudio fue aprobado por el Comité ético para estudios con animales de la Universidad Complutense (Madrid, España).

Después de 10 semanas de tratamiento, los animales se sacrificaron por decapitación. Se separaron las tibias de los tejidos blandos, se fijaron en formaldehído al 10%, tamponado a pH 7 y posteriormente se cortaron en bloques para incluirlos en resina 2-hidroxietilmetacrilato.

### Análisis histológico

Las tibias derechas obtenidas de los tres grupos se incluyeron en resina, según el método de Donath y Breuner (31), para poder cortar el hueso sin decalcificar. El estudio se realizó a nivel de la unión de la diáfisis con la metáfisis proximal de las tibias. Primero, se cortaron bloques de 20 mm de grosor y luego se efectuaron cortes transversales de 200 µm de espesor

mediante el microtomo Exakt® (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Alemania). Cada sección se adelgazó con el disco abrasivo del Exakt® hasta un grosor de 50-80 µm. Estas muestras se tiñeron con tricrómico de Masson y azul de Toluidina (32) y se observaron con microscopio óptico (Leica, Wetzlar, Alemania) en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá.

#### Análisis morfométrico

El análisis morfométrico se realizó igualmente en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá, Madrid, España.

El estudio morfométrico se llevó a cabo en las tibias derechas de los tres grupos con el analizador de imagen MIP-4 (Digital Image System, Barcelona, España), que es un sistema computarizado que puede medir áreas y volúmenes. Los parámetros morfométricos que se midieron directamente mediante el MIP-4 fueron el área total (AT), área ósea (AO), el área cortical (AC) y el área medular (AM), borde anterior (BA), cara interna (CI), cara externa (CE) y cara posterior (CP).

#### Análisis densitométrico

La densidad mineral ósea (DMO) se midió en las tibias izquierdas de los tres grupos mediante el densitómetro Norland XR-26, modalidad de investigación (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, Wisconsin, USA). La DMO se expresó en g/cm<sup>2</sup>. Este estudio densitométrico se realizó también en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana en la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá, Madrid, España.

#### Análisis estadístico

Se calcularon las medias y la desviación estándar de cada grupo. Se compararon los grupos realizando una t-Student. Los resultados y el análisis estadístico se realizaron con el programa

estadístico SPSS 22.0. Se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

Durante los 70 días que duró el estudio murieron dos ratas, pertenecientes una al grupo control joven y otra al grupo control viejo. Con lo cual, al finalizar el estudio contábamos con 13 ratas, que fueron las que se utilizaron para hacer el análisis estadístico.

#### Resultados histológicos

En las preparaciones histológicas de las secciones tibiales, se estudiaron dos zonas diferentes:

- Zona cortical, de hueso compacto.
- Zona medular, con trabéculas, situadas en la periferia y en el centro.

Ratas jóvenes: En los cortes histológicos se observó un gran número de trabéculas en la zona medular, a nivel periférico y central. La cortical era gruesa y el borde marginal no era muy evidente. (Figura 1)

Ratas viejas: En las secciones histológicas se observó que la cortical de las ratas viejas estaba más adelgazada que en las jóvenes, y el número y grosor de las trabéculas era mucho menor. El borde marginal era mayor que en las jóvenes. (Figura 2)

Ratas viejas con GH: En los cortes histológicos se observó que la cortical era mucho más gruesa que en las ratas viejas y que en las jóvenes. La cortical presentaba un aspecto normal, sin alteraciones. El borde marginal era mayor que en las viejas. Asimismo, el grosor de las trabéculas era mayor que en ambos controles, aunque el número de trabéculas era menor que en las jóvenes. (Figura 3)

#### Resultados morfométricos

##### Análisis de las ratas jóvenes versus las ratas viejas control

En el estudio morfométrico de las secciones de las tibias derechas, se observa que en ratas viejas el área total disminuyó de forma significativa ( $12,38 \text{ mm}^2 \pm 1,36$  vs  $10,07 \text{ mm}^2 \pm 1,15$ ;  $p < 0,05$ )(Figura 4) al igual que el área ósea ( $7,26 \text{ mm}^2 \pm 1,25$  vs  $4,46 \text{ mm}^2 \pm 0,75$ ;  $p < 0,05$ )(Figura 5), el área medular ( $7,60 \text{ mm}^2 \pm 0,96$  vs  $5,97 \text{ mm}^2 \pm 0,68$ ;  $p < 0,05$ )(Figura 6) y de

manera no significativa el área cortical ( $4,77 \text{ mm}^2 \pm 0,46$  vs  $4,09 \text{ mm}^2 \pm 0,59$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 7). Disminuyeron la cara posterior de la tibia de manera significativa ( $0,38 \text{ mm}^2 \pm 0,02$  vs  $0,25 \text{ mm}^2 \pm 0,02$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 11) y la cara externa de forma no significativa ( $0,34 \text{ mm}^2 \pm 0,04$  vs  $0,29 \text{ mm}^2 \pm 0,05$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 10). La cara interna de la tibia no presenta diferencias (Figura 9). Por el contrario, el borde anterior aumentó en las ratas viejas, aunque no de manera significativa ( $0,55 \text{ mm}^2 \pm 0,10$  vs  $0,61 \text{ mm}^2 \pm 0,11$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 8).

#### Análisis de las ratas viejas control versus las ratas viejas con GH

En la morfometría de las tibias de las ratas viejas tratadas con GH, se observa un aumento estadísticamente significativo del área ósea ( $4,46 \text{ mm}^2 \pm 0,75$  vs  $6,23 \text{ mm}^2 \pm 1,06$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 5) y el área cortical ( $4,09 \text{ mm}^2 \pm 0,59$  vs  $5,40 \text{ mm}^2 \pm 0,28$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 7); y de manera no significativa aumentaron el área total ( $10,07 \text{ mm}^2 \pm 1,15$  vs  $12,02 \text{ mm}^2 \pm 1,93$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 4) y el área medular ( $5,97 \text{ mm}^2 \pm 0,68$  vs  $6,61 \text{ mm}^2 \pm 2,13$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 6). También aumentaron el borde anterior ( $0,61 \text{ mm}^2 \pm 0,11$  vs  $0,87 \text{ mm}^2 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 8) y la cara interna de la tibia ( $0,33 \text{ mm}^2 \pm 0,06$  vs  $0,51 \text{ mm}^2 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) (Figura 9) de manera significativa. La cara posterior aumentó de manera no significativa ( $0,25 \text{ mm}^2 \pm 0,02$  vs  $0,29 \text{ mm}^2 \pm 0,03$ ;  $p > 0,05$ ) (Figura 11) y en la cara externa no hubo cambios (Figura 10).

### **Resultados densitométricos**

#### Análisis de las ratas jóvenes versus las ratas viejas control

La densidad mineral ósea (DMO) medida mediante densitometría disminuyó con la edad, aunque de manera no significativa ( $0,126 \text{ g/cm}^2 \pm 0,003$  vs  $0,123 \text{ g/cm}^2 \pm 0,005$ ;  $p > 0,05$ ). (Figura 12)

### Análisis de las ratas viejas control versus las ratas viejas con GH

En las ratas tratadas con GH, la DMO aumentó de manera significativa con respecto a las ratas viejas control ( $0,123 \text{ g/cm}^2 \pm 0,005$  vs  $0,138 \text{ g/cm}^2 \pm 0,006$ ;  $p < 0,05$ ). (Figura 12)

## 4. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió el efecto que produce el envejecimiento en la tibia de ratas Wistar y las modificaciones que tienen lugar en este hueso viejo cuando se administra de forma sistémica la hormona de crecimiento. Es el único trabajo, junto con el de Castillo (33), que investiga primero el efecto que el envejecimiento produce en el hueso de la rata y luego la posibilidad de mejorar este efecto mediante la administración de GH, sin embargo ella sólo realizó el análisis densitométrico, a diferencia de nuestro trabajo donde también hemos llevado a cabo el estudio morfométrico de las áreas óseas.

### 1. Efecto del envejecimiento en la tibia de rata Wistar

En este trabajo se estudiaron las diferencias entre el hueso de rata joven (de 2 meses de edad, equivalente a 5 años en humanos) y vieja (de 22 meses, equivalente a 60 años en edad humana) (34). Sin embargo, hay que tener en cuenta que tras las 10 semanas que duró el experimento las ratas al final tenían 4 y 24 meses, equivalentes según Quinn (34) a 6 años más en edad humana, es decir, a 11 y 66 años, respectivamente.

#### 1.1 Cambios histológicos

En las preparaciones histológicas de las ratas viejas se puede apreciar un adelgazamiento del grosor de la cortical, excepto del borde anterior y una disminución del número y grosor de las trabéculas a nivel medular. Estos resultados coinciden con los de Halloran et al (35) que observó en ratones una disminución del volumen de hueso trabecular y del número de trabéculas con la edad y Pietschmann et al (36) que observó un descenso de un 71% en el volumen de hueso trabecular.

#### 1.2 Disminución de la DMO

Hemos observado que con la edad se produce una disminución de la densidad mineral ósea medida mediante densitometría, aunque en este trabajo la reducción no es significativa, a

diferencia de los trabajos de Castillo (33) y Fukuda e Iida (37). Castillo (33) estudió la DMO mediante densitometría en ratas Wistar de diferentes edades (desde los 2 meses hasta los 24) y observó que se incrementaba hasta los 12 meses y a partir de aquí empezaba a descender, existiendo una reducción estadísticamente significativa a los 18 y 24 meses. Resultados similares encontraron Fukuda e Iida (37). Estos autores estudiaron 116 ratas Wistar hembras, entre los 2 y 33 meses, y observaron la máxima DMO en las tibias de ratas de 12 meses y la siguiente más alta en las ratas de 9 y 15 meses. A partir de aquí empezaba a descender, de tal forma que a los 24 meses la reducción era significativa.

Resultados opuestos obtuvieron Pietschmann et al (36), que estudiaron la pérdida de hueso relacionada con la edad en ratas macho de 23 meses de edad comparándolas con ratas de 5 meses de edad y observaron un aumento de la densidad mineral ósea a nivel cortical, aunque a nivel trabecular disminuyó.

### 1.3 Disminución de las áreas óseas

En nuestro trabajo, el área total, área ósea y área medular de la tibia medidos mediante morfometría disminuyeron significativamente con la edad, así como la cara posterior. Estos resultados difieren de los de Halloran et al (35), que examinaron los cambios que ocurrían en la metáfisis y diáfisis de la tibia de ratones a lo largo de su vida y observaron que el área ósea permaneció constante entre los 6 y 24 meses de edad.

Nuestros resultados discrepan de los de Fukuda e Iida (2004) (37) respecto a las áreas, ya que ellos encontraron que el área ósea y el área cortical de la sección tibial se incrementaron paulatinamente hasta un máximo que se alcanzó a los 33 meses. Tal vez porque la metodología fue diferente, ya que ellos lo midieron mediante tomografía computarizada.

En nuestro trabajo, el único parámetro que aumenta con la edad aunque de forma no significativa es el borde anterior; esto es debido a que a este nivel se inserta un músculo tibial que trabaja mucho al moverse la rata y por eso, a pesar de la edad, esta área aumenta.



## 2. Efecto de la administración sistémica de GH en ratas Wistar viejas

Por otra parte, se estudió el efecto que producía la administración de rhGH durante 10 semanas en el hueso de ratas viejas.

### 2.1. Cambios histológicos

En las preparaciones histológicas de las ratas viejas tratadas con GH se observó un incremento en el grosor de la cortical y del borde anterior, sin afectar al hueso trabecular, respecto a las ratas viejas control. Respecto a las ratas jóvenes, éstas tenían más trabéculas pero la cortical era más gruesa en las ratas con GH.

Estos resultados coinciden con los de Andreassen et al (38) que observaron un aumento en el grosor de la cortical de la tibia de las ratas viejas tratadas con GH a expensas de la aposición perióstica.

### 2.2. Aumento de la DMO

Se observó que la administración sistémica de GH a ratas viejas de forma crónica durante 10 semanas (6 años en edad humana) (34), aumentó la DMO de forma significativa, llegando a superar los valores existentes en ratas jóvenes. Estos datos tan espectaculares son mejores que los del resto de los autores (30, 38-41).

Este aumento en la DMO se observa sólo en los trabajos que han proporcionado la GH durante un largo tiempo, en humanos más de 12-18 meses. Ya que como concluyeron Christmas et al (30), la GH tiene un efecto bifásico respecto a la DMO. Si el tratamiento con GH dura menos de 12 meses, como la GH estimula primero la reabsorción, no da tiempo a que exista una ganancia neta de hueso, por lo que se necesita al menos un tratamiento durante 12-18 meses para observar el incremento en la DMO.

### 2.3. Aumento de las áreas óseas

En este trabajo se observó que el área ósea y el área cortical de la tibia de las ratas viejas tratadas con GH era significativamente mayor que las ratas control y también se obtuvieron resultados positivos para el borde anterior y la cara interna. Sin embargo, los resultados no fueron significativos para el área medular, por lo que se cree que la GH actúa principalmente a nivel de la cortical, teniendo menos efectos en el hueso trabecular. Estos resultados coinciden con los Andreassen et al (38), que demostraron que la GH aumentó el grosor de la cortical de la tibia y el fémur y la resistencia del cuerpo vertebral por un incremento en la masa ósea cortical, sin tener ningún efecto sobre el hueso trabecular.

Mosekilde et al (39) estudiaron el efecto de la GH en ratas con osteopenia. Inyectaron distintas dosis de GH durante tres meses de tratamiento. A partir de 1,25 mg/kg/día de GH, se obtuvieron resultados significativos, no solo revirtiendo en algunos casos la pérdida ósea inducida, sino también aumentando los valores estudiados en comparación con los controles, a los que no se les indujo la osteopenia. Determinaron que el efecto de la hormona fue mayor en aquellas partes de hueso que tienen menor hueso esponjoso. En 1999, Mosekilde et al (40), estudiaron, en ratas de 14 meses de edad, el efecto que tenía la administración de 2,5 mg/kg/día de GH durante 18 semanas. En la diáfisis femoral obtuvieron un incremento en el área ósea en comparación con los controles. Sin embargo, el área medular fue similar a los controles, lo que indica que la GH no es un “factor protector” para evitar la pérdida de hueso del endostio.

Banu et al (1999) (41), administraron 2,5 mg/kg/día de GH, 5 veces a la semana durante 10 semanas a ratas hembras de 13 meses. La GH aumentó el área ósea, el grosor de la cortical, además del contenido mineral de la cortical y el perímetro del periostio.

Al igual que en nuestro trabajo, Wang et al (2001) (42) determinaron que la GH tenía sobre todo efecto en el hueso cortical, con apenas efecto en el hueso trabecular. Cuando se compararon las ratas controles ovariectomizadas con aquellas que habían sido tratadas con GH, se observó un aumento del contenido mineral y de la densidad mineral del total del hueso, así como un aumento de grosor de la cortical. Por otra parte, determinaron un aumento del perímetro del periostio en las ratas tratadas con GH, pero no existieron cambios en la medida del endostio.

Por último, el estudio de Wang et al (2001) (43) coincide también con un aumento en todos los parámetros corticales comparándolo con las ratas controles. Pero a diferencia del resto de los autores, observó que el hueso trabecular aumentó su volumen y también el grosor de las trabéculas en ratas viejas ovariectomizadas al estudiar el cuello del fémur.

Nuestro estudio confirma la hipótesis propuesta. La hormona de crecimiento tiene un efecto positivo sobre los cambios que se generan en el hueso relacionados con la edad. Con el aumento en el grosor de la cortical ósea, de su área y densidad, se consigue aumentar la resistencia del hueso, con todas las ventajas que ello conlleva para prevenir las temidas fracturas vertebrales, de cuello de fémur o de radio en la tercera edad.

Todos los autores coinciden en que el mayor efecto que esta hormona ejerce es a nivel de la cortical ósea, con resultados similares a los conseguidos en este estudio. Otro punto en el que coinciden es en la dosis empleada. La administración de menos de 1,25 mg/kg/día no muestra resultados estadísticamente significativos. La dosis utilizada en nuestro estudio (2 mg/kg/día) es menor a la utilizada en la mayoría de los estudios (2,5 mg/kg/día) (40,41), sin embargo se observan las mismas mejoras. Esto es un punto a favor, ya que se administraría menor cantidad de hormona, economizando el tratamiento y disminuyendo los posibles efectos adversos. Lo mismo ocurre con la duración del tratamiento. Coinciden con nosotros Banu et al (41), en 10 semanas, pero el resto son más largos (Mosekilde et al, 18 semanas (40) y 3 meses (39)).

### 3. Mecanismos por los cuales la GH aumenta la DMO y las áreas óseas en el envejecimiento

En el envejecimiento se producen cambios en todos los tejidos del organismo, incluyendo el hueso, que consisten en una menor densidad mineral ósea, adelgazamiento de las corticales y disminución del número y grosor de las trabéculas del tejido esponjoso, con un aumento de la separación entre las mismas. Estos cambios están relacionados con un descenso en la formación ósea y un aumento en la reabsorción (20).

A nivel celular, se sabe que existe un menor número de osteoblastos que además tienen disminuida su función (44). Asimismo, las células osteoprogenitoras de la médula ósea están reducidas en número y función (23), lo que ocasiona que los procesos de regeneración ósea sean más lentos en los ancianos que en los jóvenes.

Respecto a los osteoclastos, se cree que están aumentados en número y actividad en el envejecimiento, probablemente debido a un aumento en el RANKL (20).

Por otro lado, la GH estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos (27) y el reclutamiento y actividad de los osteoclastos (45), por lo que estimula el remodelado óseo. Además, se sabe que tanto los osteoblastos como los osteoclastos tienen receptores para GH y también las células osteoprogenitoras. Lo que no se sabe aún es el efecto de la GH sobre el eje OPG-RANK-RANKL. A la vista de nuestros resultados, es probable que la GH estimule la formación de nuevos osteoclastos primero y osteoblastos después, para favorecer el aumento de la masa ósea y, es posible que estos efectos estén mediados por el sistema RANKL.

Asimismo, la GH estimula la absorción intestinal de calcio y fósforo, por lo que mejora la biodisponibilidad de estos minerales a nivel local, para favorecer la mineralización del nuevo tejido osteoide (24).

#### 4. Investigaciones futuras

Por todo lo anterior, nos gustaría profundizar en el mecanismo último de actuación de la GH para entender cómo produce el incremento de la masa ósea en ratas viejas estudiando su efecto a nivel de los marcadores biológicos de formación (osteocalcina, por ejemplo) y reabsorción (RANKL). Investigaciones futuras podrán llegar a clarificar esta hipótesis en aras de mejorar la calidad de vida de la tercera edad.

## 5. CONCLUSIONES

1. En ratas viejas, se observó una disminución del grosor de la cortical de la tibia así como una reducción en el número y grosor de las trabéculas al compararlas con las jóvenes.
2. En ratas viejas, se observó una disminución del área total, área ósea, área medular y cara posterior de forma significativa al compararlas con las jóvenes.
3. La densidad mineral ósea disminuyó, de forma no significativa, en las tibias de ratas viejas.
4. La administración sistémica de 2 mg/kg/día de GH, produjo un aumento del grosor de la cortical en las tibias de ratas viejas al compararlas con las viejas control.
5. En ratas viejas tratadas con GH, se observó un aumento estadísticamente significativo del área ósea, área cortical, borde anterior y cara interna de la tibia.
6. La densidad mineral ósea aumentó, de forma significativa, en la tibia de ratas viejas tratadas con GH al compararla con las ratas viejas control y también con las ratas jóvenes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodelling and healing. *Surgery*. 2011;29(4):141–145.
2. Tresguerres IF, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:E47–51.
3. Martín Monge E. Osteoporosis experimental: efecto de la administración local de hormona del crecimiento en el tejido periimplantario. [Tesis Doctoral]. Madrid. Universidad Complutense de Madrid; 2011.
4. Bayliss L, Mahoney D, Monk P. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery*. 2012;30(2):47-53.
5. Boskey AL, Coleman R. Aging and Bone. *J Dent Res*. 2010;89(12):1333–1348.
6. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309–319.
7. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 2000;21(2):115–137.
8. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(4):219–227.
9. Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang J-Y, Shin CS, et al. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2012;27(10):2075–2084.
10. Chow J, Wilson A, Chambers T, Fox S. Mechanical Loading Stimulates Bone Formation by Reactivation of Bone Lining Cells in 13-Week-Old Rats. *J Bone Miner Res*. 1998;13:1760–1767.
11. Tresguerres IF, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:E151–7.

12. Sass DA, Jerome CP, Bowman AR, Bennett-Cain A, Ginn TA, LeRoith D, et al. Short-term effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on cancellous bone in rhesus macaque monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(4):1202–1209.
13. Ohlsson C, Bengtsson B-A, Isaksson OGP, Andreassen TT, Slootweg MC. Growth Hormone and Bone. *Endocrine Reviews.* 1998;19(1):55–79.
14. Toogood AA, O'Neill PA, Shalet SM. Beyond the somatopause: growth hormone deficiency in adults over the age of 60 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(2):460–465.
15. Harman SM, Blackman MR. Hormones and Supplements: Do They Work?: Use of Growth Hormone for Prevention or Treatment of Effects of Aging. *Journal of Gerontology: Biological Sciences.* 2004;59A(7):652–658.
16. Wang X, Puram S. The toughness of cortical bone and its relationship with age. *Annals of biomedical engineering.* 2004;32(1):123-135.
17. Goldman HM, McFarlin SC, Cooper DML, Thomas CDL, Clement JG. Ontogenetic patterning of cortical bone microstructure and geometry at the human mid-shaft femur. *Anat Rec (Hoboken).* 2009;292:48–64.
18. Buenzli PR, Thomas CDL, Clement JG, Pivonka P. Endocortical bone loss in osteoporosis: The role of bone surface availability. *Int J Numer Meth Biomed Engng.* 2013;29:1307-1322.
19. Zhou S, Greenberger J, Epperly M, Goff J. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* 2008;7:335-343.
20. Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, Phleger L, Kurimoto P, Boudignon B, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. *J Bone Miner Res.* 2005;20(9):1659–1668.
21. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33(6):919–926.
22. D'Ippolito GG, Schiller PCP, Ricordi CC, Roos BAB, Howard GAG. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999;14(7):1115–1122.

23. Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J, et al. Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells*. 2009;27(6):1288–1297.
24. Hull KL, Harvey S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev. Reprod*. 2000;5(3):175–182.
25. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing - a biomechanical and histological study. *Bone*. 2003;33(4):628–637.
26. Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med*. 1990;323(1):1–6.
27. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1993;52(3):222-226.
28. Langdahl BL, Kassem M, Møller MK, Eriksen EF. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(3):176–183.
29. Raschke M, Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone*. 2001;29(4):368–373.
30. Christmas C, O'Connor KG, Harman SM, Tobin JD, Munzer T, Bellantoni MF, et al. Growth Hormone and Sex Steroid Effects on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in Healthy Aged Women and Men. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*. 2002;57(1):12–18.
31. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol*. 1982;11(4):318–326.
32. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology*. 2a ed. New York: Churchill Livingstone 1987.
33. Castillo Robles C. Efecto De La Administración De GH, Estrógenos Y Melatonina Sobre El Proceso De Envejecimiento. [Tesis Doctoral]. Madrid. Universidad Complutense de Madrid; 2005.



34. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775–777.
35. Halloran B, Ferguson V, Simske S. Changes in Bone Structure and Mass With Advancing Age in the Male C57BL/6J Mouse. *J Bone Miner. Res*. 2002;17(6):1044-1050.
36. Pietschmann P, Skalicky M, Kneissel M, Rauner M, Hofbauer G, Stupphann D, et al. Bone structure and metabolism in a rodent model of male senile osteoporosis. *Exp Gerontol*. 2007;42(11):1099–1108.
37. Fukuda S, Iida H. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats. *J Vet Med Sci*. 2004;66(7):755–760.
38. Andreassen TT, Jørgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res*. 1995;10(7):1057–1067.
39. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone*. 1998;23(4):343–352.
40. Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, McCarter RJ, Mejia W, Kalu DN. Additive effect of voluntary exercise and growth hormone treatment on bone strength assessed at four different skeletal sites in an aged rat model. *Bone*. 1999;24(2):71–80.
41. Banu MJM, Orhii PBP, Mejia WW, McCarter RJR, Mosekilde LL, Thomsen JSJ, et al. Analysis of the effects of growth hormone, voluntary exercise, and food restriction on diaphyseal bone in female F344 rats. *Bone*. 1999;25(4):469–480.
42. Wang L, Orhii PB, Banu J, Kalu DN. Effects of separate and combined therapy with growth hormone and parathyroid hormone on lumbar vertebral bone in aged ovariectomized osteopenic rats. *Bone*. 2001;28(2):202–207.
43. Wang L, Orhii PB, Banu J, Kalu DN. Bone anabolic effects of separate and combined therapy with growth hormone and parathyroid hormone on femoral neck in aged ovariectomized osteopenic rats. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(1):89–104.
44. Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology*. 2002;48(2):62–71.

45. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatani M, Kobayashi T, Chihara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology*. 1996;137(1):35–41.

## 7. TABLAS

Tabla 1: Células óseas

| ESTROMA MEDULAR               | TEJIDO ÓSEO       |
|-------------------------------|-------------------|
| Células madre hematopoyéticas | Osteoblastos      |
| Células madre mesenquimales   | Pre-osteoblastos  |
| Adipositos                    | Osteocitos        |
| Macrófagos                    | Osteoclastos      |
| Mastocitos                    | Pre-osteoclastos  |
| Células endoteliales          | Células linfoides |

Tabla 1: Células óseas y localización. Tomado de Tresguerres et al (2), con permiso)

Tabla 2: Proteínas de la matriz osteoide

|  |   |
|--|---|
| <b>Colágeno</b>  | - Tipo I  |
| <b>Proteoglicanos</b>  | - Condroitin sulfato<br>- Decroina<br>- Biglicano<br>- Hialuronano  |
| <b>Proteínas con ácido <math>\gamma</math>-carboxi-glutámico</b> | - Osteocalcina<br>- Proteína de la matriz con ácido $\gamma$ -carboxi-glutámico   |
| <b>Glicoproteínas</b>  | - Osteonectina<br>- Fosfatasa alcalina<br>- Proteínas con RGD: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibronectina</li> <li>• Trombospondina</li> <li>• Osteopontina</li> <li>• Vitronectina</li> <li>• Sialoproteínas óseas</li> </ul> |
| <b>Proteínas del plasma</b>                                      | - Albúmina<br>- $\alpha$ 2-SH-glicoproteína   |
| <b>Factores de crecimiento</b>                                   | - IGF-I y II (Insulin-like growth factor I y II)<br>- TGF- $\beta$ (Transforming growth factor-beta)<br>- PDGF (Platelet derived growth factor)   |
| <b>Metaloproteasas</b>   | - MMP1 (Colagenasa-1)<br>- MMP8 (Colagenasa-2)  |

Tabla 2: Proteínas de la matriz osteoide. Modificado de Tresguerres et al (2), con permiso.

## 8. FIGURAS



Figura 1: Histología de una rata joven (2 meses). Tinción con tricrómico de Masson. 20x.

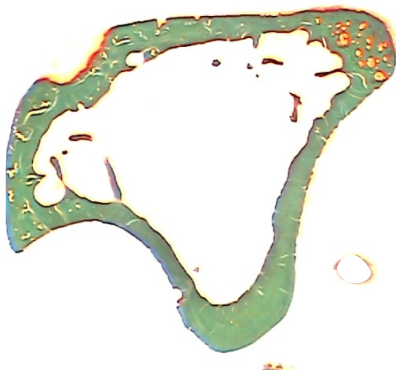


Figura 2: Histología de una rata vieja (22 meses). Tinción con tricrómico de Masson. 20x.

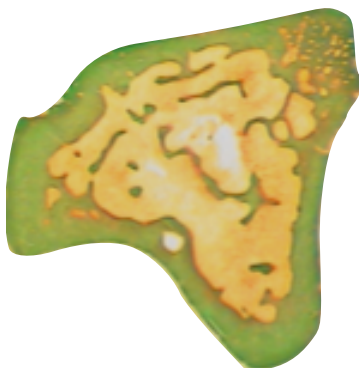


Figura 3: Histología de una rata vieja tratada con GH. Tinción con tricrómico de Masson. 20x.

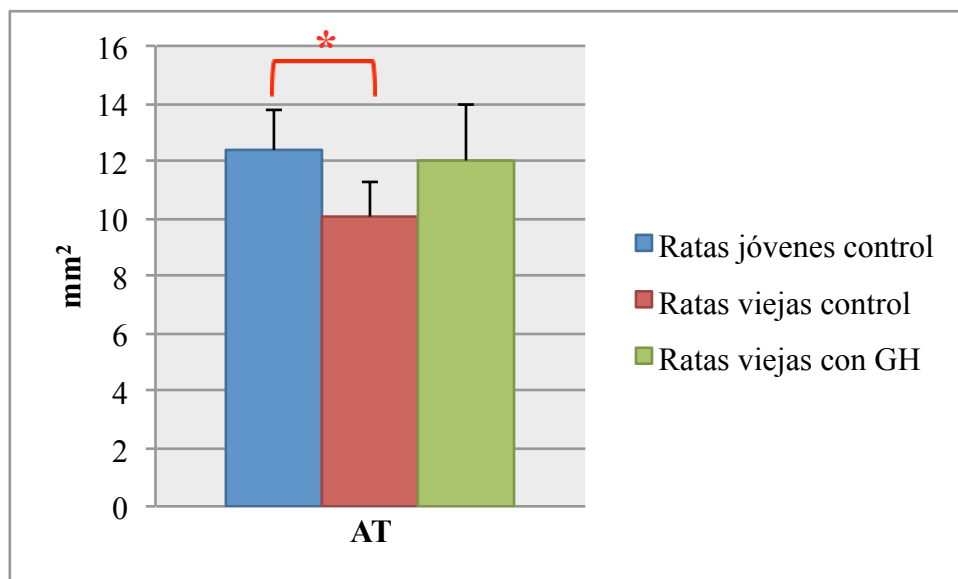


Figura 4: Morfometría: Área total (AT) (media  $\pm$  SD)

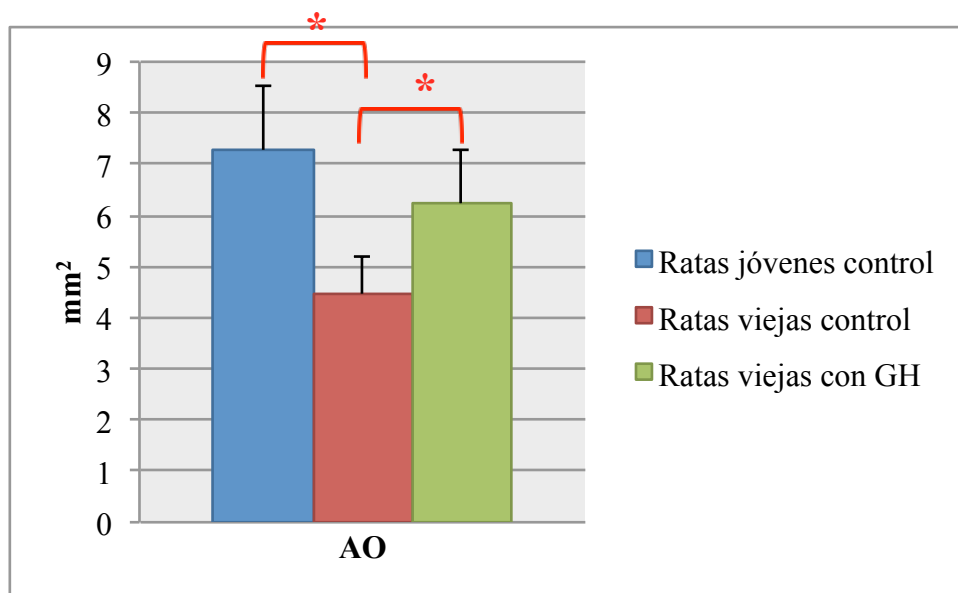


Figura 5: Morfometría: Área ósea (AO) (media  $\pm$  SD)

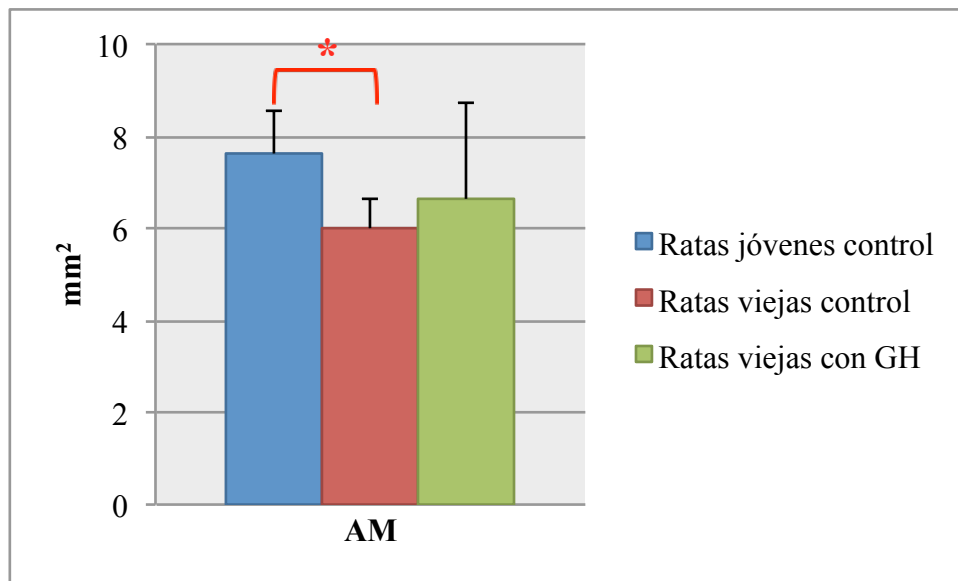


Figura 6: Morfometría: Área medular (AM) (media  $\pm$  SD)

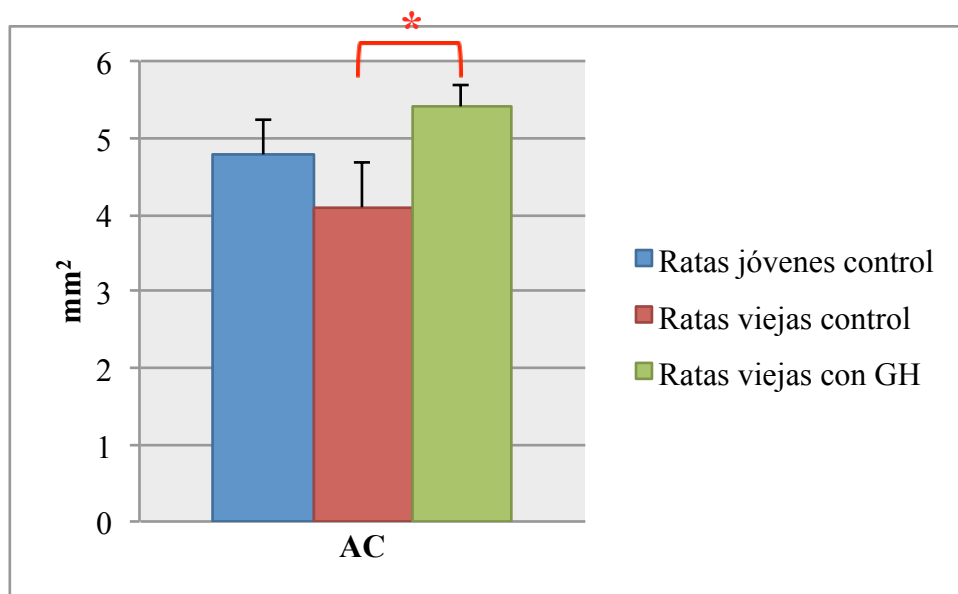


Figura 7: Morfometría: Área cortical (AC) (media  $\pm$  SD)

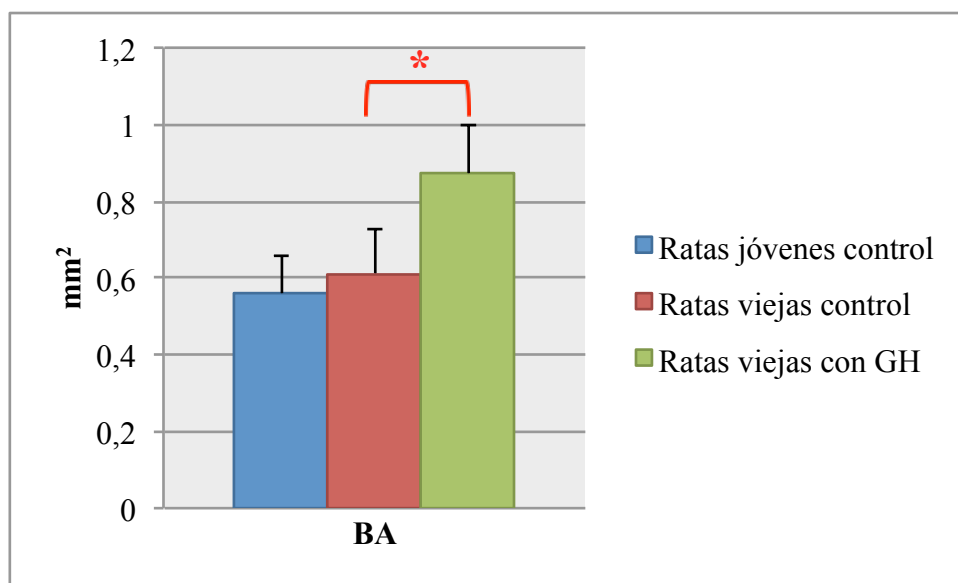


Figura 8: Morfometría: Borde anterior (BA) (media  $\pm$  SD)

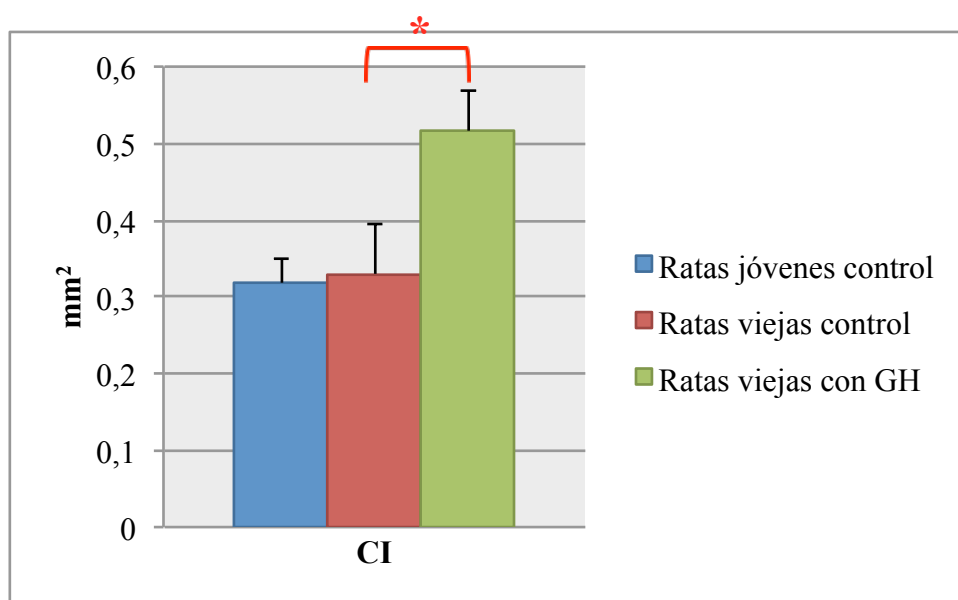


Figura 9: Morfometría: Cara interna (CI) (media  $\pm$  SD)



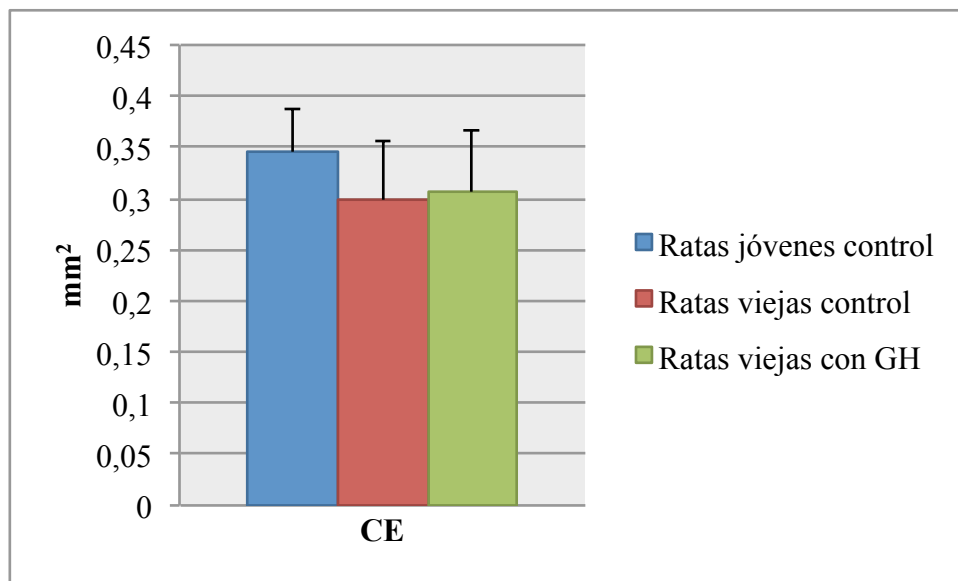


Figura 10: Morfometría: Cara externa (CE) (media  $\pm$  SD)

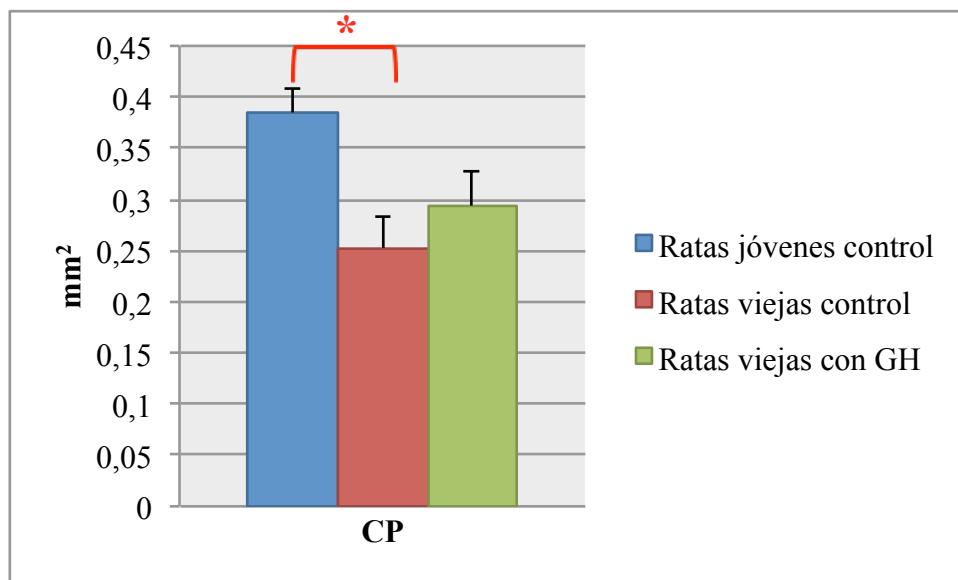


Figura 11: Morfometría: Cara posterior (CP) (media  $\pm$  SD)

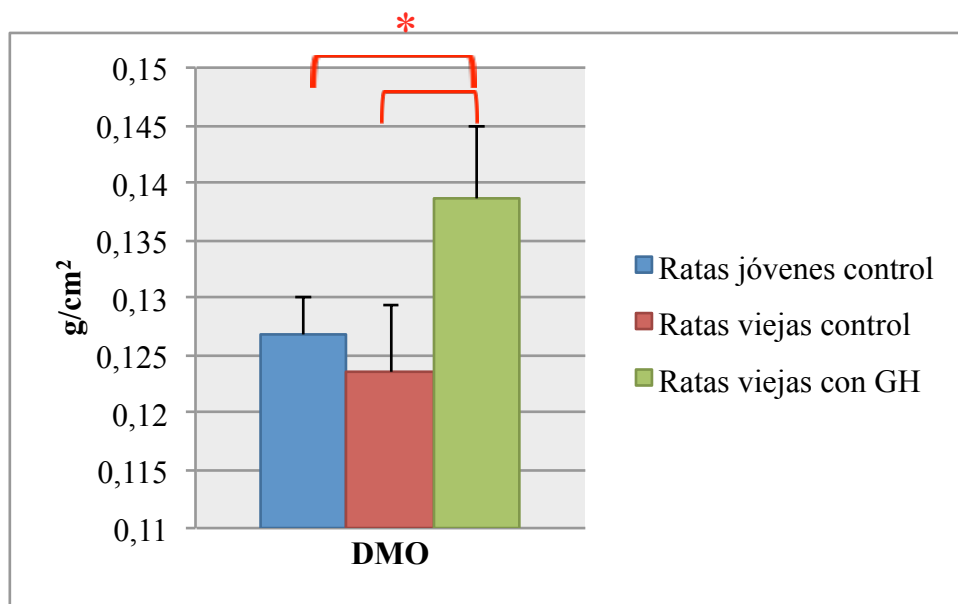


Figura 12: Densitometría (media  $\pm$  SD)